

III. MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penyediaan hewan coba di laboratorium kimia terapan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Pembuatan (VCO) serta pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya pada bulan Januari hingga Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

Alat yang dipersiapkan untuk mendukung penelitian yaitu kandang mencit, penggaris, *punch biopsy*, clipper, wadah plastik, toples plastik, saringan, corong. Bahan yang dipersiapkan antara lain tikus *Sprague Dawley*, anestesi ketamin, anestesi atropin, spuit, masker medis, gloves, tissue, kapas, povidon iodine 10%, kelapa tua dan air mineral.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *random sampling*. Penelitian ini terbagi menjadi dua kelompok dengan masing-masing menerima perlakuan yang berbeda. Beberapa perlakuan yang diberikan kepada kelompok-kelompok dalam penelitian merupakan : K1 (Kelompok 1) adalah tikus *Sprague Dawley* yang dilakukan eksisi pada bagian kulit dengan menggunakan *punch biopsy* tanpa pemberian terapi VCO. K2 (Kelompok

2) adalah tikus *Sprague Dawley* yang telah dilakukan eksisi pada bagian kulit dengan menggunakan *punch biopsy* dan dilakukan pemberian terapi VCO.

3.3.2 Sampel Penelitian

Hewan coba standar yang dipakai dalam penelitian adalah tikus Sprague-Dawley jantan, berumur 3 bulan, dan berat badan 300 gram. Dua perlakuan digunakan dalam penelitian ini, dan populasi dihitung menggunakan rumus Federer $= (n-1) k \geq 16$. Catatan: n (ulangan), k (kelompok perlakuan). Hasil perhitungan rumus Federer adalah $(n-1) k \geq 16 = (n-1) 2 \geq 16 = 2n - 2 \geq 16 = 2n \geq 18 = n \geq 9 = n = 9$ ekor.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah variabel bebas : VCO, Variabel kendali : tikus *Sprague Dawley*. Variabel terikat : luas area luka dan skor kondisi luka.

3.5 Parameter Penelitian

Parameter Penelitian ini adalah luas area luka dan skor kondisi luka. Luas area luka terdiri dari pengamatan penutupan luka. Skor kondisi luka terdiri dari kebengkakan, kemerahan, dan eksudasi.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sampel penelitian menggunakan tikus sebagai subjek eksperimen. Tikus yang digunakan galur Sprague Dawley Jantan berusia 3 bulan dengan berat badan sebesar 300 gram. Sebelum dimulainya penelitian, tikus diadaptasi selama 7 hari. Mereka ditempatkan secara individu di kandang konvensional yang tertutup. Tikus memiliki akses bebas terhadap air minum dan diberi pakan pelet sebanyak 10% dari berat badan mereka setiap pagi dan sore hari, dengan total 30 gram pakan per hari. Tikus dibagi menjadi dua perlakuan, masing-masing terdiri dari 9 ekor. Mereka dipelihara di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma di Surabaya.

3.6.2 Desain Penelitian

Setelah persiapan selesai maka hewan percobaan dibagi kedalam 2 kelompok. Kelompok K1 dilukai tanpa pengobatan, Kelompok K2 dilukai dan diobati dengan VCO. Terapi ini selama 14 hari dengan interval sehari 1 kali.

3.6.3 Pembuatan *Virgin Coconut Oil*

Proses pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO) dimulai dengan persiapan lima buah kelapa tua. Setelah itu, kelapa dikupas dan dagingnya dipisahkan dari kulit dan tempurungnya yang berserat, kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya, daging kelapa diparut dan dihaluskan, kemudian dicampur dengan air bersih dan diperas. Cairan yang dihasilkan dari perasan tersebut disimpan dalam wadah plastik. Proses pengepresan dilakukan dua kali : yang pertama dengan

mencampurkan ampas kelapa dengan air bersih, kemudian diperas kembali, dan sari buah yang dihasilkan disaring ke dalam wadah plastik. Cairan tersebut kemudian didiamkan selama 10 jam. Setelah proses sedimentasi, terbentuklah tiga lapisan : air di bagian bawah, sedimen di tengah, dan VCO di bagian atas. VCO yang terbentuk kemudian disimpan dalam wadah yang bersih dan higienis untuk penggunaan selanjutnya (Winarti, 2007).

3.6.4 Induksi Luka Eksisi

Pemeliharaan objek coba dimulai menggunakan 18 ekor tikus jantan galur Sprague Dawley, masing-masing memiliki berat 300 gram dan berumur 3 bulan, yang kemudian diadaptasi selama satu minggu. Setelah periode adaptasi, tikus-tikus tersebut dicukur bulunya dan kemudian dianastesi menggunakan campuran ketamine (50 mg/kg BB) dan atropine (0,05 mg/kg BB) secara Intraperitoneal. Mereka kemudian diinduksi dengan luka eksisi berdiameter 6 mm di punggung menggunakan *punch biopsy*. Tikus-tikus dibagi menjadi dua kelompok: Kelompok K1, yang hanya dilukai tanpa mendapat pengobatan, dan Kelompok K2, yang dilukai dan diberi terapi menggunakan VCO. Terapi VCO diberikan sekali sehari selama periode 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-7 dan 14 untuk evaluasi efek terapi tersebut (Franco, 2013).

3.6.5 Terapi VCO

Terapi dilaksanakan dengan menerapkan VCO secara topikal sekali sehari, yaitu dengan mengoleskannya langsung pada area luka yang terbuka. Pengamatan penyembuhan luka dilakukan secara makroskopis setiap interval 7 hari. Terapi diberikan selama periode 14 hari.

3.6.6 Pengamatan luas area luka

Pengukuran luas area luka dengan menghitung diameter luka untuk mendapatkan nilai persentase area. Diameter diukur secara berkala, kemudian hasilnya dirata-ratakan dan dihitung luasnya berdasarkan rumus : $P\% = \frac{do - dx}{do} \times 100\%$. Dalam penelitian ini, P% (persentase penyembuhan luka) dihitung dengan membandingkan diameter luka awal (do) dengan diameter luka pada hari observasi (dx). Pengukuran luas luka dilakukan dari hari ke-7 hingga hari ke-14, dibandingkan dengan luas luka pada hari ke-0, untuk mengevaluasi tingkat penyembuhan luka, sesuai metode yang dijelaskan oleh (Rodero dan Khosrotehrani, 2010).

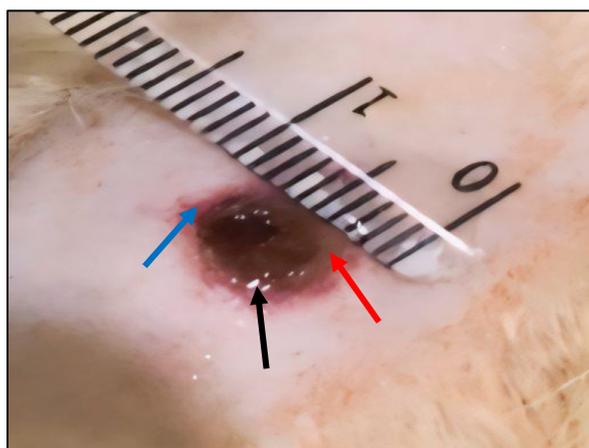
3.6.7 Pengamatan skor kondisi luka

Kondisi klinis dari luka eksisi dapat diklasifikasikan ke dalam lima skor yang berbeda. Skor 0 : Tidak terdapat tanda-tanda kebengkakan, peradangan, atau infeksi. Area eksisi telah sepenuhnya sembuh, tanpa adanya jaringan terbuka, dan tidak ada tanda eksudat keropeng atau kering. Skor 1 : Tidak ada kebengkakan yang terlihat, namun masih terdapat kemerahan lokal pada 25% area eksisi. Mungkin ada eksudat basah atau kering. Skor 2 : Kebengkakan terlihat pada 25% area luka,

dengan kemerahan lokal mencakup 50% area eksisi. Eksudat basah atau kering mungkin hadir di 25% area eksisi. Skor 3 : Kebengkakan mencakup 50% area luka, dengan kemerahan mencakup 75% area eksisi. Eksudat basah hadir di 75% area eksisi. Skor 4 : Kebengkakan melibatkan lebih dari 75% area luka, dengan kemerahan menyebar sepanjang area eksisi. Eksudat basah atau nanah mungkin hadir di sepanjang luka eksisi (Marti *et al*, 2017).

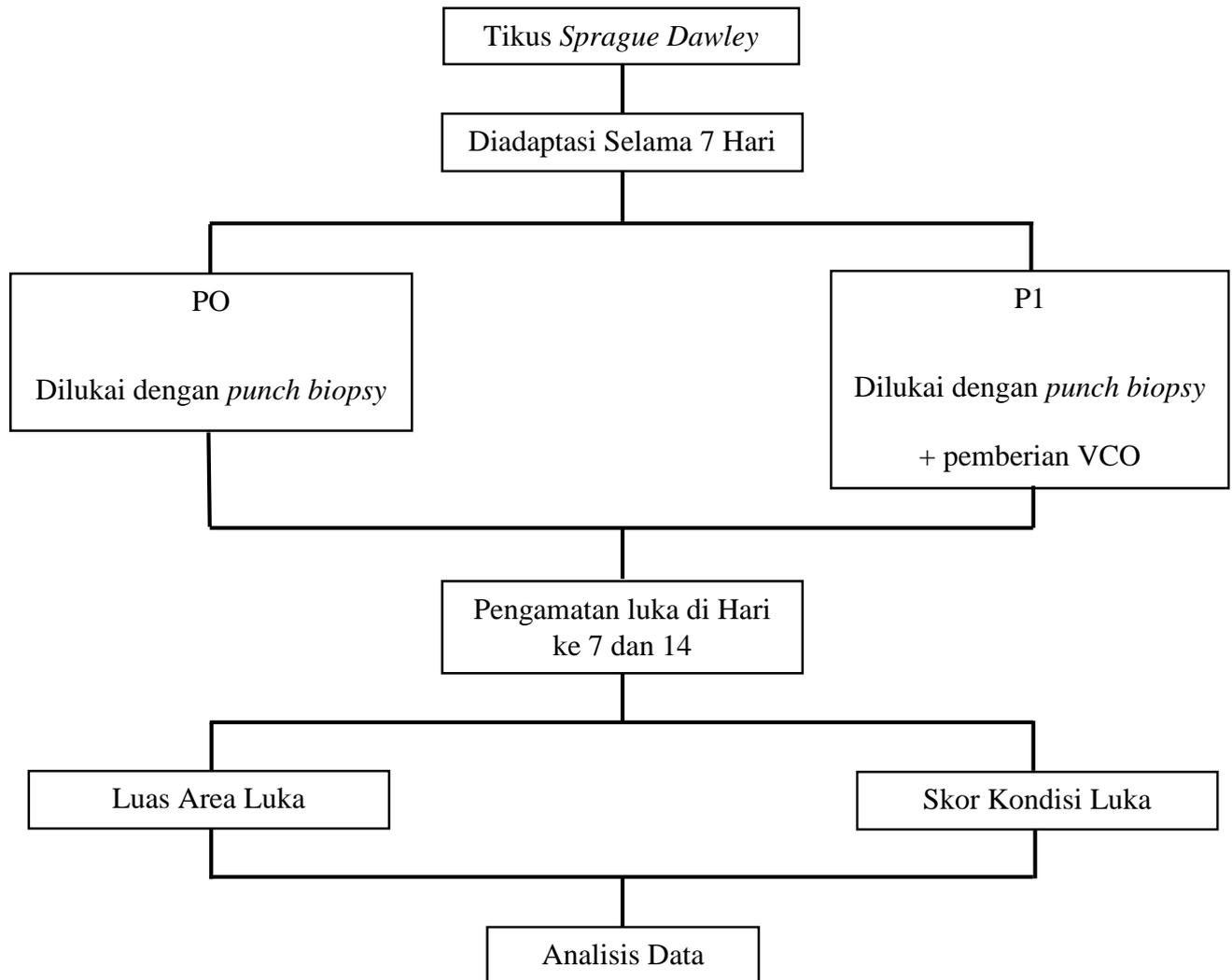


Gambar 3.1 Metode luas area luka. Diameter 1 (garis warna merah), Diameter 2 (garis warna biru). Pengukuran dapat menggunakan Rumus $D1+D2$.



Gambar 3.2 Metode skor kondisi luka. Kebengkakan (tanda panah warna merah), eritema (tanda panah warna biru), eksudasi (tanda panah warna hitam).

3.7 Kerangka Penelitian



Gambar 3.3 Kerangka Penelitian

3.8 Analisi Data

Data yang sejenis dan normal dianalisis menggunakan uji parametrik dengan uji *T Test*. Data yang tidak homogen dan tidak normal diuji dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney U Test*. Derajat kepercayaan 95%. Analisis data dilakukan menggunakan SPSS versi 26.

2.3.2 Fase *Remodelling*

Fase *Remodeling* terjadi mulai dari 21 hari hingga 1 tahun setelah cedera. Pada tahap ini, fibroblas mulai melepaskan diri dari jaringan granulasi, kemerahan pada jaringan luka mulai memudar, dan jumlah serat kolagen-fibrin meningkat untuk memperkuat jaringan parut. Proses ini dipermudah oleh konversi kolagen tipe III menjadi kolagen tipe I, sesuai dengan penjelasan yang disampaikan oleh (Lawrence, 2002). Fase ini dicirikan oleh perubahan struktur luka agar menyerupai jaringan aslinya.

2.4 *Virgin Coconut Oil*

2.4.1 Pengertian

Seperti yang diuraikan (Handayani 2010), VCO adalah minyak kelapa yang murni kemudian diproduksi tidak menggunakan pemanasan atau dengan pemanasan minimal. Dalam proses produksinya, daging kelapa diproses tanpa pemanasan atau dipanaskan pada suhu rendah, menghasilkan minyak dengan ciri-ciri seperti warna bening, tanpa bau, dan bebas dari radikal bebas yang dihasilkan selama proses pemanasan (Lucida dkk, 2008).

2.4.2 Kandungan VCO

VCO memiliki kandungan asam lemak rantai yang mudah dicerna dan teroksidasi di dalam tubuh, sehingga membantu mencegah penumpukan dalam tubuh. Selain itu, VCO kaya akan antioksidan tokoferol dan beta-karoten yang berperan penting dalam melawan penuaan dini begitu juga menjaga vitalitas tubuh.

Komposisi utama VCO sekitar 90% terdiri dari asam lemak jenuh dan sekitar 10% asam lemak tak jenuh. Asam lemak jenuh utama dalam VCO adalah asam laurat, yang menyumbang sekitar 53% dari total komposisi, diikuti oleh asam kaprilat dengan kontribusi sekitar 7%. Kedua asam lemak ini termasuk dalam kategori asam lemak rantai menengah (MCFA), yang dikenal sebagai asam lemak rantai menengah. Secara keseluruhan, VCO mengandung sekitar 92% lemak jenuh, 6% lemak tak jenuh tunggal, dan 2% lemak tak jenuh ganda (Price, 2004).

2.4.3 Manfaat VCO

VCO telah terbukti memberikan sejumlah manfaat penting dalam proses penyembuhan luka. Ini termasuk kemampuannya untuk melembabkan luka, mempercepat metabolisme sel, serta sifat antiinflamasi dan antiinfeksi terhadap luka kimawi. Penelitian yang dilakukan (Agero *and* Verallo Rowell, 2004) menunjukkan bahwa VCO mampu mempercepat waktu penyembuhan luka dan meningkatkan tingkat kesembuhan.

Komponen biologis aktif dalam VCO memiliki sifat antimikroba, layaknya asam lemak trigliserida yang dapat berganti monogliserida dan asam lemak bebas ketika berinteraksi dalam tubuh, seperti yang dijelaskan (Lucida dkk, 2008).

Selain itu, pada saat dioleskan pada luka dan goresan, VCO membentuk lapisan yang tipis untuk melindungi luka dari debu, bakteri, dan virus sehingga dapat mempercepat penyembuhan (Careline, 2014). Sifat antibiotik, antibakteri, antijamur, dan antivirus dari VCO disebabkan oleh kandungan utamanya, yaitu asam laurat. Penelitian (Barlina dkk, 2006) menunjukkan bahwa tubuh mengubah

asam laurat menjadi monolaurin, yang efektif dalam menghancurkan virus dan bakteri seperti *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Dengan demikian, penerapan VCO pada luka dapat secara signifikan mempercepat proses penyembuhan, dengan luka dapat sembuh dalam waktu sekitar 4-5 hari, seperti yang diungkapkan oleh (Robert, 2014).

2.4 Tikus *Sprague Dawley*

2.5.1 Klasifikasi Tikus Putih

Berdasarkan klasifikasinya Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) termasuk kedalam kingdom *Animalia*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Vetebrata*, Class *Mamalia*, Ordo *Rodentia*, Family *Muridae*, Genus *Rattus* dan Spesies *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769).



Gambar 2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

2.5.2 Karakteristik Tikus Putih Sebagai Hewan Uji

Tikus sering digunakan sebagai objek dalam penelitian karena mirip

secara fisiologis dengan manusia, memiliki siklus hidup yang singkat, dan ukuran tubuh yang cukup kecil. Selain itu tikus juga memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap lingkungan penelitian. Oleh karena itu, tikus merupakan pilihan yang populer sebagai model hewan untuk berbagai penelitian ilmiah (Kartika dkk, 2013).

Ada tiga strain tikus yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah: strain Sprague Dawley, strain Wistar, dan strain Long Evans. Ras Sprague Dawley ditandai dengan kepala kecil, badan berwarna putih, dan ekor yang lebih panjang dari badannya. Tikus strain Wistar, sebaliknya, memiliki kepala yang lebih besar dan ekor yang lebih pendek dibandingkan dengan tikus Sprague Dawley. Sementara itu, tikus strain Long-Evans memiliki ukuran tubuh yang lebih kecil daripada tikus putih dan tidak memiliki warna hitam di bagian depan kepala dan badannya (Adiyati, 2011).

Tikus putih sering digunakan dalam penelitian biomedis karena memiliki kemiripan dengan sistem biologi mamalia secara umum. Tikus ini dianggap sebagai model yang cocok untuk penelitian praklinik, sebagaimana disampaikan oleh (Fitria dan Saro, 2014). Penentuan umur reproduktif pada tikus melibatkan pemahaman terhadap berbagai fase kehidupan dan perilaku. Beberapa fase tersebut meliputi rentang usia hidup antara 2-3,5 tahun, dimulai dari saat disapih pada usia 3 minggu (21 hari), fase kematangan seksual atau pubertas yang dimulai pada usia 6 minggu (40-60 hari), fase pradewasa pada usia 63-70 hari, fase kematangan sosial sekitar 5-6 bulan (160-180 hari), dan fase penuaan yang dimulai pada usia 15-24 bulan (Sengupta, 2013).

